



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b>  <b>G01N 33/543, 33/548, 33/564</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/14964</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 24. April 1997 (24.04.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE96/01910 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 3. Oktober 1996 (03.10.96)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 195 38 641.8      5. Oktober 1995 (05.10.95)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> PRI- VATES INSTITUT BIOSERV GMBH [DE/DE]; Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18059 Rostock (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HEINRICH, Hans-Werner [DE/DE]; Hauptstrasse 4, D-17498 Riemserort (DE). RAM- LOW, Wolfgang [DE/DE]; Kolbruchweg 18a, D-18209 Bad Doberan (DE). BOEDEN, Hans-Friedrich [DE/DE]; Brehmestrasse 50, D-13187 Berlin (DE). NEUMANN, Hans-Georg [DE/DE]; W.-Raabe-Strasse 1, D-18146 Rostock (DE). MEYER, Udo [DE/DE]; Mitteldorfsstrasse 4, D-18239 Hastorf (DE). TELLER, Joachim [DE/DE]; Enge Strasse 6, D-18273 Güstrow (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> BAUMBACH, Fritz; BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlichlich</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu          veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> PATIENT-SPECIFIC IMMUNOADSORBENTS FOR EXTRACORPORAL APHERESIS AND METHODS OF PRODUCING SAID IMMUNO-ADSORBERS		
<b>(54) Bezeichnung:</b> PATIENTENSPEZIFISCHE IMMUNOADSORBER FÜR DIE EXTRAKORPORALE APHERESE UND VERFAHREN FÜR DEREN HERSTELLUNG		
<b>(57) Abstract</b>  The invention relates to the production of multiple-application patient-specific immunoadsorbents which can be used for extracorporeal apheresis in patients suffering from disorders caused by dysregulation of the immune system. Conventional methods are used to isolate the immune complexes from the patient's blood and appropriate methods are applied to separate the immune complexes into antigens and antibodies. The antigens and antibodies thus reactivated are coupled individually or as a mixture covalently to suitable carriers which are used as immunoadsorbents for the patient from whom the immune complexes originate. This facilitates production of specific immunoadsorbents even for patients suffering from rare auto-immune diseases.		
<b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft die Herstellung vielseitig anwendbarer, patientenspezifischer Immunadsorber, die für die extrakorporale Apherese bei Patienten eingesetzt werden können, die an Erkrankungen leiden, die durch Dysregulation des Immunsystems bedingt sind. Mittels herkömmlicher Verfahren werden aus dem Patientenblut die Immunkomplexe isoliert, die durch geeignete Methoden in Antigen und Antikörper getrennt werden. Die so reaktivierten Antigene und Antikörper werden einzeln oder als Gemisch kovalent an geeignete Träger gekoppelt, die als Immunadsorber für den Patienten eingesetzt werden, von dem die Immunkomplexe stammen. Damit können spezifisch wirkende Immunadsorber hergestellt werden auch für Patienten, die an seltenen Autoimmunkrankheiten leiden.		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LT	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Letland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

## **Patientenspezifische Immunadsorber für die extrakorporale Apherese und Verfahren für deren Herstellung**

### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft die Herstellung von Immunadsorbern auf der Grundlage der spezifischen Antikörper und/oder Antigene, die in Folge von immunpathologischen Prozessen für die Auslösung oder Aufrechterhaltung vieler Erkrankungen verantwortlich sind. Dadurch wird es möglich, gezielt in den immunpathologischen Regulationskreis einzugreifen, der für die klinischen Folgen verantwortlich ist, ohne das gesamte Immunsystem in Mitleidenschaft zu ziehen, wie es z.B. bei der herkömmlichen Therapie durch medikamentöse Immunsuppression der Fall ist.

Darüber hinaus ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Anreicherung und Reindarstellung der immunpathologisch relevanten körpereigenen Stoffe und eröffnet damit neue Möglichkeiten für die Ursachenforschung und Therapieentwicklung.

Die funktionelle Grundlage für die Immunreaktion ist komplex und beruht auf dem gut regulierten Zusammenwirken von lokalen und systemisch wirksamen zellulären und humoralen Elementen der unspezifischen Abwehr und dem System der spezifischen Abwehr, bestehend aus aktivierten Zellen des lymphopoetischen Systems und den von ihnen produzierten Mediatoren und Antikörpern.

Je nach der Art der Stimulierung können die vorherrschenden Abwehrleistungen unterschiedlich sein.

Diese Steigerung der Abwehrlage wird auf natürliche Weise im Verlauf eines Infektionsgeschehens oder künstlich, d.h. medikamentös, erworben. Das erfolgt sowohl systemisch als auch lokal über die Schleimhäute des Respirations-, Digestions- und Urogenitaltraktes.

Natürlicherweise reagiert der Organismus sofort auf eine Infektion. Die Qualität und Quantität der Sofortreaktion hängt ab von der Art des Antigens und dem Ort des Eindringens. Prinzipiell gleiche Reaktionen erfolgen bei Verabreichung von Impfstoffen und anderen körperfremden Substanzen. Eine spezifische Abwehr, meßbar z.B. durch den Nachweis spezifischer Antikörper,

ist erst nach einigen Tagen wirksam. Ist die auslösende Ursache beseitigt, wird die Produktion spezifischer Antikörper nach unten reguliert und letztlich eingestellt. Nach erfolgtem biologischen Abbau der Antikörper weisen nur noch das Vorhandensein spezifischer "Gedächtniszellen" darauf hin, mit welchen Antigenen sich der Organismus in der Vergangenheit auseinander gesetzt hat. Unter bestimmten Umständen, im einzelnen meist nicht mehr bestimmbarer Kausalität, reagiert der Organismus in überschießender Weise auf körpereigene Strukturen. Die sich entwickelnde Autoimmunreaktion führt zur fortlaufenden Destruktion körpereigenen Gewebes, deren Abbauprodukte wiederum das Immunsystem stimulieren. Wird dieser pathologische Regelkreis nicht unterbrochen, sind die Folgen letztlich zumindest für das betroffene Gewebe fatal.

Erkrankungen immunpathologischer Genese oder Beteiligung sind häufig. Durch ihren chronischen Verlauf und ihre schwere Therapierbarkeit beeinträchtigen sie die Lebensqualität der betroffenen Menschen erheblich und verursachen enorme volkswirtschaftliche Verluste. Eine der häufigsten Autoimmunkrankheiten ist die Rheumatoide Arthritis, an der etwa 1 % der Bevölkerung erkrankt. Das Hauptmanifestationsalter der Erkrankung liegt um das 40. Lebensjahr. Nach 10 Jahren sind etwa 50 % der Patienten erwerbsunfähig und 10 - 20 % schwerstbehindert. Die bislang erreichten Behandlungsergebnisse durch Immunsuppression und unterstützende Therapien sind unzureichend und enden häufig in Therapieabbrüchen. Nach 3 Jahren sind maximal nur noch 50 % der initial mit Basistherapeutika behandelten Patienten unter effektiver Medikation.

Wegen der häufig unzureichenden Wirksamkeit und großer Nebenwirkungen herkömmlicher immunsuppressiver Therapie wird ständig nach neuen Therapieverfahren zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen gesucht (J.Sany: Early approaches to immunotherapy of rheumatoid arthritis. EUR-J-RHEUMATOL-INFLAM: 11(1991), 139 - 147).

Diese Therapien zielen auf die Beeinflussung von humoralen und zellulären Immunmechanismen wie auch von Mediator-Systemen. Es

handelt sich dabei um experimentelle Therapieansätze, die im Tierversuch und in der klinischen Erprobung erste Erfolge brachte. Ein entscheidender Durchbruch in der Prognose von Patienten mit Autoimmunkrankheiten konnte allerdings bislang nicht erzielt werden.

Plasmaaustausch und Plasmasorption sind erfolgreich bei einer Vielzahl von Autoimmunkrankheiten und Erkrankungen immunpathologischer Beteiligung eingesetzt worden (R.T. Baldwin, R. R. Pierce und O. H. Frazier: Guillain-Barre syndrome after heart transplantation. J-HEART-LUNGTRANSPLAN: 11 (1992), 817-819; J. Braun, J. Sieper, A. Schwarz, F. Keller, J. Heitz und H.V. Ameln: Severe lupus crisis with agranulocytosis and anuric renal failure due to a mesangial lesion (WHO IIB)-Successful treatment with cyclophosphamide pulse followed by plasmapheresis (2). BR-J-RHEUMATOL: 30 (1991), 312-313; P. C. Dau: Plasma-pheresis in acute multiple sclerosis: Rationale and results. J-CLIN-APHERESIS: 6 (1991), 200-204; H. H. Euler, J. O. Schroeder, R. A. Zeuner und E. Teske: A randomized trial of plasma-pheresis and subsequent pulse cyclophosphamide in severe lupus: Design of the LPSG trial. INT-J-ARTIF-ORGANS: 14 (1991), 639-646; D. C. Hess, K. Sethi und E. Awad: Thrombotic thrombocytopenic purpura in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid antibodies: Effective treatment with plasma exchange and immunosuppression. J-RHEUMATOL: 19 (1992), 1474-1478; R. Korinthenberg und M. Sauer: The Guillain-Barre syndrome in childhood. Clinical course and therapeutic measures. MONATSSCHR-KINDERHEILKD: 140 (1992), 792-798)

Der Plasmaaustausch ist das ältere Therapieverfahren, bei dem separiertes Plasma (Membranplasmapherese oder Zentrifugation) verworfen und simultan und durch Spenderplasma oder Humanalbumin ersetzt wird. Während einer Behandlung wird die einfache bis doppelte Menge des Patientenplasma ausgetauscht. Dieses Verfahren ist nicht selektiv. Um einen oder wenige pathogenetisch wichtige Bestandteile zu entfernen, wird das gesamte Plasma ausgetauscht und Substanzen verworfen, die für den Patienten essentiell sind. Das hat schwerwiegende Folgen für den Patienten, die man versucht mit verschiedenen Substitutionsthe-

rapien auszugleichen. Daneben besteht die Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern wie das HIV oder Hepatitisserreger.

Bei der Plasmasorption wird das zuvor separierte Plasma über Adsorbermaterial geleitet. An das Adsorbermaterial sind Stoffe gekoppelt, die mit bestimmten Plasmabestandteilen eine Bindung eingehen und diese dadurch aus dem Patientenplasma entfernen. Wird die Plasmasorption zum Entfernen von immunologisch bedeutsamen Substanzen genutzt, wird das Verfahren als Immunadsorption bezeichnet. Das Verfahren besitzt in Abhängigkeit vom verwendeten Adsorbermaterial eine unterschiedliche Selektivität und Spezifität. Diese wiederum bedingt Effektivität der Therapie und Nebenwirkungen. Unterschiedliche Liganden und Träger sind zur Adsorption von Immunglobulinen und Immunkomplexen aus dem separierten Plasma klinisch eingesetzt worden:

#### Tabelle 1:

Beispiele von Liganden mit klinischer Anwendung in extrakorporalen Apherese-Verfahren

- Staphylokokken-Protein A
- hydrophobe Aminosäuren (Tryptophan bzw. Phenylalanin)
- Dextransulfat
- aggregiertes IgG
- anti-Human-IgG
- Blutgruppen-Antigene

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über erfolgreich mit der extrakorporalen Immunadsorption behandelte Autoimmunerkrankungen.

#### Tabelle 2:

Autoimmunerkrankungen	mit	erfolgreicher	Apherese-
/Immunadsorptions-Behandlung			

## 5

- rapid-progressive Glomerulonephritis, fokale Glomerulosklerose
- systemischer Lupus erythematodes
- Anti-Phospholipid-Syndrom
- Vaskulitiden; z. B. Periarteriitis nodosa, M. Wegener
- Rheumatoid-Arthritis
- immunologische thrombozytopenische Purpura
- Hemmkörper gegen Koagulationsfaktoren
- hyperimmunisierte bzw. ABO-inkompatible prospektive Transplantat-Empfänger
- Polymyositis
- neurologische Erkrankungen; z.B. Guillain-Barre-Syndrom, Polyneuropathie, amyotrophe Lateralsklerose, Myasthenia gravis, Multiple Sklerose

**Nachteil der medikamentösen Therapien bei Autoimmunerkrankungen**

Die medikamentöse Immunsuppression ist unselektiv und unspezifisch. Auch neuartige immunologische Therapien (monoklonale oder polyklonale Antikörper gegen Aktivierungsmarker oder Rezeptorstrukturen von Immunzellen und Mediatoren) supprimieren die Immunantwort nicht selektiv und/oder induzieren ihrerseits Immunphänomene im Organismus.

**Nachteile von bisherigen Apherese/-Adsorptionsverfahren in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen**

Der Nachteil aller bisher bekannten Apherese-/Adsorptionssysteme besteht analog zur medikamentösen Immunsuppression in ihrer unzureichenden Selektivität. Das gilt für das bereits angewendete Verfahren von Balint und Hargreavens (US-Patent 4.681.870), die Staphylococcus-aureus-Protein A an geeignete Träger immobilisierten. Mit dieser Methode werden aus dem Patientenblut unspezifisch IgG und IgG-Komplexe entzogen. Das trifft auch auf das von Davis (PCT-Anmeldung WO 86/07152) beschriebene Verfahren der Nutzung von trägergekoppelten unspezifischen Proteinen, vorzugsweise Immunglobuline verschiedener Spezies, als Immunadsorbents von Immunkomplexen zu. Mittels dieser Methode werden wohl Immunkomplexe aus dem eliminiert,

nicht aber die reaktiven Einzelbestandteile, die bei Autoimmunkrankheiten ständig neu entstehen.

Liberti und Pollora (US-Patent 4.551.435) beschreiben ein Verfahren zur Entfernung von Stoffen und Immunkomplexen aus dem Blut, indem das Patientenblut mit spezifischen Antikörpern einer bestimmten Konzentration versetzt wird, die dann mit der zu eliminierenden Substanz Immunkomplexe bilden. Diese werden aus dem Blut mit Faktoren wie Clq, Rheumafaktoren, Fc-Rezeptoren und Fc-Rezeptoren-tragenden Zellen, die an einen festen Träger immobilisiert sind, aus dem Blut eliminiert. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die auslösende Ursache bekannt ist, was bei den meisten Fällen von Autoimmunkrankheiten nicht der Fall ist und daß das ursächliche Antigen für die Herstellung von Antikörpern gereinigt vorliegt. Die Entfernung der Immunkomplexe selbst erfolgt unspezifisch nicht über Protein A, sondern durch Biomoleküle, die physiologischerweise eine hohe Affinität zu Immunglobulinen haben.

Es gilt zu beachten, daß die pathophysiologisch relevanten Immunstrukturen bei den einzelnen Autoimmunerkrankungen verschieden sind, selbst die Immunphänomene bei ein- und derselben Erkrankung. Der Einsatz bislang verfügbarer Apherese-Systeme führt nicht nur zur Eliminierung der immunpathologisch bedeutsamen sondern auch der physiologischen - für die körpereigene Abwehr essentiellen - Immunglobuline. Das Resultat ist eine generelle Schwächung des Immunsystems mit der Gefahr septischer Komplikationen.

Die Erfindung hat das Ziel, eine Therapie für Patienten zur Verfügung zu stellen, die an Krankheiten leiden, die durch Dysregulation des Immunsystems bedingt sind oder die sich durch immunpathologische Prozesse zu chronischen, schwer therapierbaren Verlaufsformen entwickeln. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, einen für den jeweiligen Patienten spezifischen Immunadsorber zu entwickeln, mit dessen Hilfe die pathogenetisch bedeutsamen Immunkomplexe, Autoantikörper und Antigene durch Adsorption aus dem Blut oder Plasma des Patienten entfernt werden können.



Diese Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen 1 und 7 gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Dazu werden die Immunkomplexe mit bekannten Verfahren, z.B. mittels Protein A - Immunadsorbern, aus dem Plasma des Patienten entfernt und nach entsprechender Elution in ihre biologisch aktiven Bestandteile zerlegt. Jetzt können die Bestandteile durch bekannte Verfahren, z.B. Gel-Chromatographie, getrennt und einzeln, bzw. als Gemisch von Antikörpern und Antigenen an entsprechendes Trägermaterial gekoppelt werden. Mit Hilfe dieser Immunadsorber können aus dem Plasma des Patienten spezifisch die krankheitsbedeutenden Immunkomplexe, Antikörper und Antigene mittels Plasmapherese entfernt werden. Diese Säulen sind reaktivierbar und zum mehrfachen Gebrauch vorgesehen. Die Herstellung solcher patientenspezifischer Immunadsorber ist generell für jede Krankheit möglich, wo Autoimmunkomplexe eine pathogenetische Rolle spielen.

Die Lösung dieser Aufgaben ergibt sich aus den Patentansprüchen.

Der patientenspezifische Immunadsorber besteht gemäß der Erfindung aus getrennten Antigenen und/oder Antikörpern aus Immunkomplexen pathologisch relevanter Immunfaktoren von Patienten, die an aktivierte feste Trägermaterialien gebunden sind. Er enthält getrennte Antigene und/oder Antikörper von Patienten, die an Erkrankungen leiden, die durch Dysregulation hervorgerufen oder aufrechterhalten werden. Autoimmunkrankheiten oder immunpathologische Reaktionslagen sind u.a.

Rheumatoid-Arthritis, rapid-progressive Glomerulonephritis, systemischer Lupus erythematosus, Antiphosphoid-Syndrom, Vaskulitiden, histoinkompatiblen Transplantatempfängern, Polymyositis, neurologische Autoimmunkrankheiten oder immunpathologische Dysregulationen in Folge von Infektionskrankheiten. Geeignet als Trägermaterialien sind alle bioverträglichen Stoffe, die ausreichend viele Immunkomplexbestandteile auf ihrer Oberfläche kovalent binden können; bevorzugt ist der Einsatz von Sepharose und Perlcellulose.

Das Verfahren zur Herstellung der patientenspezifischen Immunsorber ist durch folgende Schritte gekennzeichnet:

Immunkomplexe werden zunächst mit bekannten, nicht selektiven Verfahren, z.B. mittels Protein A - Immunsorbern, aus dem Plasma der Patienten entfernt und nach entsprechender Elution in ihre biologisch aktiven Bestandteile zerlegt. Jetzt können die Bestandteile durch bekannte Verfahren, z.B. Gel-Chromatographie, getrennt oder einzeln, bzw. als Gemisch von Antikörpern und Antigen an entsprechendes Trägermaterial gekoppelt werden. Bevorzugt ist die Zerlegung der Immunkomplexe im sauren bzw. alkalischen Milieu, vorzugsweise in pH-Bereichen von 2-5 bzw. 10-12 in ihre Einzelbestandteile, die ggf. nach Fraktionierung und ggf. nach Zusatz von Salzen wie NaCl, MgCl<sub>2</sub>, LiCl oder Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid, die geeignet sind, ab einer bestimmten Konzentration die Reaktionspartner im dissoziierten Zustand zu halten, in einem pH-Bereich von 2-12 mittels an sich bekannter Methoden an die festen Materialien gekoppelt werden.

Mit Hilfe dieser Immunsorber können aus dem Plasma des Patienten spezifisch 'seine', die krankheitsbedeutenden Immunkomplexe, Antikörper und Antigene mittels extrakorporaler Immunsorption entfernt werden. Diese Säulen sind reaktivierbar und zum mehrfachen Gebrauch vorgesehen. Die Herstellung solcher patientenspezifischer Immunsorber ist generell für jede Krankheit möglich, wo Autoimmunkomplexe eine pathogenetische Rolle spielen.

Das Verfahren ermöglicht neben der therapeutischen Anwendung die Isolierung von Stoffen aus dem Patientenblut, die für die Auslösung der immunologischen Dysregulation zumindest mitverantwortlich sind. Das vereinfacht Untersuchungen zur Pathogenese von Autoimmunkrankheiten bzw. von Erkrankungen, die durch immunologische Fehlleistungen in ihrem Verlauf verstärkt werden. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen Lösungen ist:

1. Es werden nicht nur die Immunkomplexe entfernt, sondern auch die bisher nicht erfaßten einzelnen Reaktionspartner.

2. Eine Substitution mit Fremd-Immunglobulinen ist nicht mehr notwendig (Krankheitsübertragung wie HIV werden ausgeschlossen, zusätzliche Kosten vermieden).

3. Ohne Wissen der Krankheitsursache können kostengünstig patientenspezifische Immunadsorber hergestellt werden. Damit können spezifische Therapiewerkzeuge auch für solche Autoimmunkrankheiten bereitgestellt werden, für die wegen der geringen Erkrankungshäufigkeit gezielte Entwicklungen durch die Industrie aus Kostengründen abgelehnt werden.

4. Es können die Antigene und/oder Antikörper spezifisch angereichert, isoliert und damit für weitere Untersuchungen bereitgestellt werden, die für die Auslösung bzw. Aufrechterhaltung der Autoimmunkrankheit des einzelnen Patienten verantwortlich sind.

Im folgenden wird die Erfindung näher erläutert.

Patienten, die an Autoimmunkrankheiten wie z.B. Rheumatoid-Arthritis, Lupus erythematoses oder Multibler Sklerose leiden, werden einer extrakorporalen Apherese unter Verwendung von Staphylokokken-Protein A-Immunadsorbern unterzogen. Nach Beendigung eines Apheresezyklus wird die Säule gründlich mit einem Puffer gewaschen, dem Detergenzien zugesetzt sind, oder die durch eine erhöhte Ionenkonzentration (z.B. 1 - 3 mol/l NaCl) adsorptiv gebundene Plasmabestandteile von der Säule entfernen. Das Freisein von adsorptiven Plasmabestandteilen wird durch Elektrophorese oder Immunassay des Spülpuffers überprüft. Anschließend erfolgt die Elution der Immunglobuline, der Immunkomplexe und der dissoziierten immunologischen Reaktionspartner mittels eines pH-Gradienten (z.B. Citrat oder Acetatpuffer pH 7 - 2) oder konzentrierten Salzlösungen unterschiedlichen pH-Wertes (zwischen 4 und 7). Mittels Elektrophorese, Chromatographie oder anderen geeigneten Trennverfahren werden die eluierten Fraktionen hinsichtlich ihres Proteinspektrums und Dissoziationsgrades von Immunkomplexen untersucht.

Für die Immobilisierung an feste Träger werden Fraktionen verwendet, in denen die Immunkomplexe in ihre reaktiven Bestandteile aufgespalten sind. Diese können vor der Kopplung bei Bedarf durch geeignete Trennverfahren separiert werden. Die Immunkomplexbestandteile werden einzeln oder als Gemisch mittels bekannter Verfahren an ONB-Carbonat- oder N-Hydroxy-succinimide-ethylester aktivierte Trägermaterialien gekoppelt. Nach Entfernen aller nicht gebundenen Bestandteile steht ein patientenspezifischer und regenerierbarer Immunadsorber zur Verfügung, mit dessen Hilfe selektiv aus dem Patientenblut nur die Stoffe entfernt werden, die für die immunpathologische humorale Dysregulation verantwortlich sind.

Anschließend wird die Erfindung an Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### Ausführungsbeispiel 1

Modelluntersuchungen zur Bestimmung der biologischen Aktivität von immobilisierten humanen IgG durch Bindung von anti-human IgG (Ziege) - Tabelle 3

Die Kopplung des humanen IgG an die jeweiligen Träger (Sepharose 6FF und Pericellulose) erfolgte unter Elutionsbedingungen. Cl-CO-ONB-aktiviertes Gel mit ca. 30  $\mu\text{mol}$  ONB-Carbonatgruppen pro ml wurde für die Kopplung des humanen IgG verwendet.

1 ml Antiserum (5,3 mg anti-human IgG) wurde mit 1 ml PBS verdünnt und über die jeweiligen Träger gegeben (Flußrate von 0,1 ml / min). Die Säulen wurden mit mehreren Säulenvolumen PBS und 3 M NaCl pH 5,0 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Glycin-HCl, 0,05 % Tween 20, pH 2,0 (Flußrate 1,0 ml / min, 2 - 6 °C). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm nach Neutralisation der Eluate mit 0,5 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Die relative Antikörperbindungskapazität pro ml Gel ist bezogen auf die Kopplung von humanen IgG unter Standardbedingungen (0,5 M Phosphatpuffer, 0,05 % Tween 20, pH 7,2).

Ausführungsbeispiel 2

Modelluntersuchungen zur Bestimmung der Bindungskapazität von humanen IgG (Antigen), immobilisiert mittels Basen-aktivierte ONB-Carbonat Sepharose 6FF bei pH 3,0, durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von anti-human IgG (Antikörper) im Überschuß - Tabelle 4

Für die Kopplung wurde humanes IgG (Sigma) im Kopplungspuffer gelöst und filtriert (0,2 µm). Diese Lösung wurde der Lösungsmittelfeuchten aktivierten Sepharose zugesetzt. Die Kopplung erfolgte bei Raumtemperatur (1 h) unter vorsichtiger Bewegung. Nach Blockung (1 M Ethanolamin in 0,1 M Borat, pH 8,0) für 1 h wurde das Gel intensiv gewaschen, z.B. an einer Fritte mit je dem 10-fachen des Säulenvolumens in der Abfolge: Kopplungspuffer - Wasser - 0,01 N HCl - Wasser - 24 h 0,1 Boratpuffer, pH 8,3 - Wasser.

Die Affinitätschromatographie erfolgte bei 2 - 6 °C mit dem ECONO-System (Bio-Rad) unter Verwendung der Säule Omnifit 5,0 x 0,3 cm I.D. (350 µl Gel). Es wurden Flußraten zwischen 0,25 und 1,0 ml/min gewählt. Die Elution wurde mittels UV-Durchflußphotometer (280 nm) vermessen. Nach der Antikörperbindung und Waschen mit PBS werden die Antikörper nach folgenden Programm eluiert:

1. 30 min PBS
  2. 60 min 3 M NaCl pH 5
  3. 30 min PBS
  4. 60 min 0,1 M Glycin\*HCl pH 2,0
  5. 30 min PBS
- Flußrate 0,25 ml/min

Ausführungsbeispiel 3

a) Elution von anti-HSA Antikörpern (Kaninchen) aus Antikörper-Antigen-Komplexen mit HSA unter Verwendung von HSA-beschichteter Mikrotiterplatten zur Ermittlung optimaler Elutionsbedingungen für die Affinitätschromatographie (Tabelle 5)

Die 96-Well Mikrotiterplatten wurden mit HSA beschichtet. Jedes Well wurde mit 0,1 µg anti-HSA inkubiert. Als Detektionssystem (ELISA) diente anti-Kaninchen-IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Substrat: 4-Nitrophenylphosphat,  $\lambda_{405\text{nm}}$ ).

200 µl des jeweiligen Elutionspuffers wurden in die Wells pipettiert. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur im Verlaufe von einer Stunde unter ständiger Bewegung der Mikrotiterplatte. Nach gründlichen Waschen der Wells erfolgte die Detektion des anti-HSA. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Messungen von jeweil 8 Wells gebildet (%CV=4,4). Der Prozentsatz eluierter anti-HSA-Antikörper mit PBS wurde mit 0 % festgelegt.

Tabelle 5:

<u>Elutionspuffer zur Lösung der Ak-Ag-Komplexe</u>	
<u>Eluierte anti-HSA-AK (%)</u>	
PBS, pH 7,3	0
PBS + 1 % SDS, pH 7,3	51
0,10 M Citrat, pH 2,5 <sup>a</sup>	100
0,10 M Citrat, pH 3,0 <sup>a</sup>	73
0,10 M Citrat, pH 3,5 <sup>a</sup>	27
0,10 M Citrat, pH 4,0 <sup>a</sup>	8
0,05 M Citrat, pH 2,5 <sup>a</sup>	100
0,10 M Citrat/Phosphat, pH 7,3	0
0,10 M Citrat/Phosphat, pH 6,0	0
0,10 M Citrat/Phosphat, pH 5,0	0
0,10 M Citrat/Phosphat, pH 4,0	2

3,00 M KSCN, pH 7,3	41
3,00 M NaCl, pH 5,0*	0
3,00 M Guanidin*HCl, pH 7,3	66
4,00 M Guanidin*HCl, pH 7,3	90
6,00 M Harnstoff, pH 7,3	7
0,10 M Borat, pH 11,0	35
0,10 M Phosphat, pH 11,5	49
0,10 M Phosphat, pH 12	91

\* mit 0,05 % Tween 20

b) Immobilisierung von anti-HSA-HSA an Basen-katalysierte, aktivierte ONB-Carbonat-Sepharose 6FF in Kopplungsmedien, die als Elutionsmedien für Immunaффinitätschromatographie genutzt werden (Tabelle 6)

Die mit dem zu koppelnden Protein versetzten und filtrierten (0,45  $\mu$ m) Kopplungsmedien wurden der feuchten aktivierten ONB-Carbonat-Sepharose 6FF zugegeben. Die Kopplung erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung. Danach wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Ethanolamin in Boratpuffer (pH 8,1) blockiert. Die ONB-Carbonatgruppen wurden spektro-photometrisch ( $\lambda_{\max}$ : ca. 267 nm) bestimmt.

0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,3 diente zur Bestimmung des Referenzwertes für eine maximale Immobilisierung.

Das Waschen erfolgte wie in Beispiel 2.

Die anti-HSA-Antikörper wurden in einem Vorversuch mittels Affinitätschromatographie (0,05 - 0,1 M Citrat, pH 2,0) gewonnen, mit 0,5 M  $K_2HPO_4$  neutralisiert, bei - 20 °C aufbewahrt und nach dem Auftauen für die Kopplung mit verdünnter HCl auf pH 3,0 bzw. 4,0 eingestellt.

Für die Kopplung des Ag-Ak-Gemisches wurde das HSA in PBS gelöst, mit verdünnter HCl auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und der Antikörperlösung zugesetzt.

Die Proteinbestimmung im Kopplungspuffer erfolgte spektrophotometrisch  $OD_{280\text{ nm}}$  (Antikörper  $E^{0.1\%} = 1,38$  und HSA  $E^{0.1\%} = 0,67$ ). Die immobilisierten Proteine wurden nach Behandlung der Gele mit 1 N NaOH im Überstand nach Lowry bestimmt.

Kopplungsergebnis (%) ist die relative Menge immobilisierten Proteins im Bezug zur angebotenen Proteinmenge.

#### Ausführungsbeispiel 4

Nachweis der biologischen Aktivität (Bindungsfähigkeit) von Antigenen und Antikörpern am Modell von anti-HSA/HSA nach Immobilisierung unter Spaltbedingungen für Immunkomplexe (Tabelle 7)

An Basen-katalysierte, aktivierte ONB-Carbonat-Sepharose 6FF wurde unter Elutionsbedingungen (pH 3,0; pH 4,0; 4 M Guanidin\*HCl) wie in den Ausführungsbeispielen 1 und 3b) beschrieben mit anti-HSA/HSA gekoppelt. Nach Waschen der Säule wurde HSA bzw anti-HSA im Bindungspuffer angeboten. Nach erneuten Waschen der Säule mit PBS erfolgte die Elution (pH 2,0) und photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration.

Mit diesen Modellversuchen wird nachgewiesen, daß sowohl Antigen (HSA) wie auch Antikörper (anti-HSA) aus Immunkomplexe (anti-HSA/HSA), die unter Spaltbedingungen an einen Träger immobilisiert werden, ihre Bindungsfähigkeit erhalten. Das aus Immunkomplexen immobilisierte HSA band stets anti-HSA, daß sich nach erneuter Elution im ELISA durch eine hohe Reaktivität zu HSA auszeichnete (Ergebnisse nicht dargestellt). Unter Voraussetzung, daß 1 Mol HSA ein Mol anti-HSA bindet, wurden aus den Immunkomplexen (Versuch 3) 0,9 mg HSA/ml Gel immobilisiert, die 2,1 mg anti-HSA banden. Ähnliche Ergebnisse ließen sich mit den Versuchen 5, 7, 13 und 16 reproduzieren. Das aus den Immunkomplexen immobilisierte anti-HSA (Kaninchen-IgG) wird in diesem Modell auch unter Standardkopplungsbedingungen zwar effizient immobilisiert, der Erfolg kann mit anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen werden, aber offensichtlich erfolgt die Kopplung hier in einem Molekülbereich,



der zu sterischen Behinderungen für die Bindung des HSA führt. Die Antikörper selbst erhalten ihre biologische Aktivität.

#### Ausführungsbeispiel 5

Affinitätschromatographie des Plasmas eines Lupus erythematoses-Patienten (gleichzeitig Standardverfahren)

Das Plasma eines unter Lupus erythematoses leidenden Patienten stand zur Verfügung. Für die Gewinnung der gesamten  $\gamma$ -Globuline wurde eine Protein A-Säule (PHARMACIA) verwendet. Die Immobilisierung der Antikörper erfolgte über ONB-Carbonat aktivierte Sepharose 6 FF (20  $\mu\text{mol/ml}$ ).

#### Pufferlösungen für die Immunadsorption

Puffer PA	pH 7,0	1000 ml	Der pH Wert wird mit HCl oder NaOH eingestellt
Trinatriumcitrat	3,30 g		
Natriumacetat x 3H <sub>2</sub> O	5,45 g		
Natriumchlorid	4,90 g		
Dinatriumhydrogenphosphat	2,91 g		
Kaliumdihydrogenphosphat	0,26 g		
Eluant PA	pH 2,2	1000 ml	Der pH Wert wird mit HCl oder NaOH eingestellt
Zitronensäure x H <sub>2</sub> O	6,12 g		
Natriumchlorid	9,00 g		

16

Waschpuffer 3 M NaCl	1000 ml	Der pH Wert wird mit HCl oder NaOH eingestellt
pH 7,0		
Trinatriumcitrat	3,30 g	
Natriumacetat x 3H <sub>2</sub> O	5,45 g	
Natriumchlorid	175,00 g	
Dinatriumhydrogenphosphat	2,91 g	
Kaliumdihydrogenphosphat	0,26 g	
Tween 20	0,50 g	
Zitratpuffer 0,1 M pH 2,2	250 ml	Der pH Wert wird mit NaOH eingestellt
Zitronensäure	5,25 g	

#### Methoden:

Eine Protein A-gekoppelte Säule (5 ml Gel, Pharmacia) wurde mit Puffer PA äquilibriert. 20 ml hochtourig zentrifugierten, frischen Plasmas wurden 1:2 mit Puffer PA gemischt und aufgetragen. Zur Chromatographie bedienten wir uns eines Econo-Systems (BIORAD). Das Plasma wurde nach verlassen der Säule erneut aufgetragen, um eine vollständige Adsorption zu erreichen. Intensives Waschen mit 5 Säulenvolumen PA war notwendig, um nicht adsorbiertes Material zu entfernen. Unspezifisch gebundene Proteine beseitigte Waschpuffer, der 3 M NaCl enthielt. Mit 0,1 M Citratpuffer, 0,05 % TWEEN 20 pH 2,2 eluierten die Immunglobuline und Proteine aus den Immunkomplexen als scharfer Peak. Das Volumen des Eluates betrug 6,5 ml. Die Proteinkonzentration wurde über die UV-Absorption bei  $\lambda_{280 \text{ nm}}$  mit 17,6 mg/ml bestimmt. Sofort nach der Elution erfolgte die Kopplung der getrennt vorliegenden IgG und Proteine an die ONB-Carbonat-aktivierte Sepharose. Dazu wurden 6 ml des nach

Herstellervorschrift vorbereiteten, abgesaugten Gels zu dem Eluat gegeben und 1h geschüttelt. Das Eluat hat wegen der Pufferwirkung der darin gelösten Proteine einen pH-Wert zwischen 3 und 4. Freie Bindungen mußten mit 1 M Ethanolamin in 0.1 M Boratpuffer pH 8,0 abgesättigt werden. Durch Vergleich der Proteinkonzentrationen in den vereinigten Waschlösungen mit dem Protein A-Eluat stellten wir eine Bindungseffizienz von 57% fest. Nach gründlichem Waschen steht das Gel als Träger für affinitätschromatographische Experimente zur Verfügung.

Dazu wurden 40 ml Patientenplasma zentrifugiert, 1:2 mit PA verdünnt und 2 mal über die Säule gegeben. Ungebundenes bzw. unspezifisch gebundenes Material wurde durch aufeinanderfolgendes Waschen mit je 10 Säulenvolumen PA, Waschpuffer und PA entfernt. Mit 0,1 M Citratpuffer pH 2,2 wurde das spezifisch gebundene Protein eluiert (Abbildung 1).

Die Plasmaproteine und die chromatographisch gewonnenen Fraktionen wurden in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Standardverfahren analysiert (Miniprotean II, BioRad). Die Gele waren Gradientengele von 10 - 25 % Monomerkonzentration. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Abbildungen 2 und 3).

Aus der Abbildung 2 ist ersichtlich, daß im Protein A-Eluat neben Antikörpern noch weitere Proteine vorhanden sind. Nach deren Immobilisierung sind sie in der Lage, die entsprechenden Reaktionspartner aus dem Patientenplasma spezifisch zu binden. Im Elutionspeak 2 (0,1 M Citratpuffer, pH 2,2) nach der Affinitätschromatographie (Abb. 1) konnten mehrere Proteine in der PAGE identifiziert werden. Neben Immunglobulinen und mehreren höhermolekularen Proteinen, sind 3 Proteine entscheidend angereichert, die nach PAGE des Protein A-Eluates nur als kaum sichtbare Banden nachweisbar sind (Abb. 3). Sie haben eine relative Molmasse um 40 kD.

#### Ausführungsbeispiel 6

# Affinitätschromatographie des Plasmas eines Multiple Sclerose-Patienten

Plasmaaufarbeitung, Protein A-Elution und Kopplung der Eluatproteine geschah analog zum Ausführungsbeispiel 5. Nach Abwaschen adsorptiv gebundener Proteine vom Immunadsorber (Peak 1, Abb. 4) wird mit dem Elutionspuffer spezifisch gebundenes Protein von der Matrix abgelöst, daß sich nach PAGE (Abb. 5) als ein Proteingemisch erweist, in dem hauptsächlich Immunglobuline vorhanden sind.

## Ausführungsbeispiel 7

### Affinitätschromatografie des Plasmas eines Rheumatoide Arthritis-Patienten

Plasmaaufarbeitung, Protein A-Elution und Kopplung der Eluatproteine geschah analog zum Ausführungsbeispiel 5. Nach Abwaschen adsorptiv gebundener Proteine vom Immunadsorber (Peak 1, Abb. 6) wird mit dem Elutionspuffer spezifisch gebundenes Protein von der Matrix abgelöst, daß sich nach PAGE (Abb. 7) als ein Proteingemisch erweist, in dem hauptsächlich Immunglobuline vorhanden sind.

Legende zu den Abbildungen 1 bis 6

Abb. 1:

Elutionsprofil des Patientenplasmas nach Adsorption an die mit homologen Antikörpern und Antigenen gemäß Standardverfahren gekoppelte Sepharose 6FF

Die Markierungen kennzeichnen den Pufferwechsel beim Waschen und Eluieren (die Beladung der Säule wird nicht angezeigt):  
Nr. 1 - Waschpuffer, Nr. 2 - 0,1 M Citratpuffer pH 2,2

Abb. 2:

PAGE des Eluates von der Protein A-Säule vor und nach der Kopplung an die ONB-Carbonat-aktivierte Sepharose

Nr. 1/2 = 5 bzw. 10 µl Material vor Kopplung, Nr. 3 = 10 kD-Leiter, Nr. 4 = γ-Globulinstandard, Nr. 5-8 wie 1-4, aber nach Kopplung (d.h. nicht gebundenes Material)

Abb. 3:

PAGE des Eluates, das bei pH 2,2 von der Immunosorbent-Säule nach Passieren des homologen Plasmas gewonnen wurde

Nr. 1-7/9-15 = Peakfraktionen, Nr. 8/17 = 10 kD Proteinmarker, Nr. 16 = Nachspülung

Abb. 4:

Elutionsprofil des Patientenplasmas nach Adsorption an die mit homologen Antikörpern und Antigenen gemäß Standardverfahren gekoppelte Sepharose 6FF

Die Markierungen kennzeichnen den Pufferwechsel beim Waschen und Eluieren (die Beladung der Säule wird nicht angezeigt):  
Nr. 1 - Waschpuffer, Nr. 2 - 0,1 M Citratpuffer pH 2,2

## Abb. 5:

PAGE des Eluates, das bei pH 2,2 von der Immunosorbent-Säule nach Passieren des homologen Plasmas gewonnen wurde

Nr. 1 = 10 kD Standards, Nr. 2 =  $\gamma$ -Globulinstandard, Nr. 3 = Peakfraktion (Peak 2 Abb. 4), Nr. 4 = Peakfraktion nach Einengen über Amicon centrifree®

## Abb. 6:

Elutionsprofil des Patientenplasmas nach Adsorption an die mit homologen Antikörpern und Antigenen gemäß Standardverfahren gekoppelte Sepharose 6FF

Die markierungen kennzeichnen den Pufferwechsel beim Waschen und Eluieren (die Beladung der Säule wird nicht gezeigt): Nr. 1 - Waschpuffer, Nr. 2 - 0,1 M Citratpuffer pH 6,0/Tween, Nr. 3 - 0,1 M Citratpuffer pH 2,2

## Abb. 7:

PAGE des Eluates, das bei pH 2,2 von der Immunosorbent-Säule nach Passieren des homologen Plasmas gewonnen wurde

Nr. 1-4 = Proteine aus dem Waschpuffer, Nr. 5/6 = Peakfraktionen (Peak 3 Abb. 6), Nr. 7 = 10 kD Standards, Nr. 8 =  $\gamma$ -Globulinstandard

**Patentansprüche**

1. Patientenspezifische Immunadsorber, bestehend aus getrennten Antigenen und/oder Antikörpern aus Immunkomplexen pathologisch relevanter Immunfaktoren von Patienten, gebunden an aktivierte feste Trägermaterialien.

2. Patientenspezifische Immunadsorber nach Anspruch 1, enthaltend getrennte Antigene und/oder Antikörper von Patienten, die an Erkrankungen leiden, die durch Dysregulation des Immunsystems hervorgerufen oder aufrechterhalten werden.

3. Patientenspezifische Immunadsorber nach Anspruch 1 und 2, enthaltend getrennte Antigene und/oder Antikörper von Patienten, die an Autoimmunkrankheiten oder immunpathologischen Reaktionslagen, wie Rheumatoide Arthritis, rapid-progressive Glomerulonephritis, systemischer Lupus erythematodes, Multiple Sklerose, Anti-Phosphoid-Syndrom, Vaskulitiden, histoinkompatible Transplantatempfänger, Polymyositis, neurologische Autoimmunkrankheiten oder immunpathologische Dysregulationen in Folge von Infektionskrankheiten leiden.

4. Patientenspezifische Immunadsorber nach Anspruch 1 - 3, enthaltend getrennte Antigene und/oder Antikörper von Patienten, die an Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematodes oder Multiple Sklerose leiden.

5. Patientenspezifische Immunadsorber nach Anspruch 1 - 4, gebunden an bioverträgliche Stoffe, die ausreichend viele Immunkomplexbestandteile auf ihrer Oberfläche kovalent binden können.

6. Patientenspezifische Immunadsorber nach Anspruch 1 - 5 gebunden an Sepharose oder Perlcellulose.
7. Verfahren zur Herstellung patientenspezifischer Immunadsorber gemäß Ansprüchen 1 - 6, gekennzeichnet durch Isolierung von Immunkomplexen aus Blut oder anderen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Liquor cerebrospinalis; von Patienten unter Verwendung bekannter Verfahren, wie Plasmapherese über Protein A - Immunadsorber, Reinigung der Immunkomplexe für den klinischen Einsatz im extrakorporalen Blutreinigungsverfahren und Spaltung in die aktiven Bestandteile Antikörper und Antigene sowie kovalente Kopplung dieser Bestandteile an feste Trägermaterialien.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunkomplexe im sauren bzw. alkalischen Milieu, vorzugsweise in pH-Bereichen von 2 - 5 bzw. 10 - 12, und/oder unter Zusatz von Salzen wie NaCl, MgCl<sub>2</sub>, LiCl oder Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid in ihre Einzelbestandteile zerlegt und, ggf. nach Fraktionierung und ggf. nach Zusatz von Salzen wie NaCl, MgCl<sub>2</sub>, LiCl oder Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid, die geeignet sind, ab einer bestimmten Konzentration die Reaktionspartner im dissoziierten Zustand zu halten, in einem pH-Bereich von 2 - 12 mittels an sich bekannter Methode an die festen Materialien gekoppelt werden.
9. Verwendung der patientenspezifischen Immunadsorber gemäß Ansprüchen 1 - 6 für die extrakorporale Apherese.
10. Verwendung der patientenspezifischen Immunadsorber gemäß Ansprüchen 1 - 6 für die Gewinnung und Weiterbearbeitung der immunpathologisch bedeutsamen körpereigenen Stoffen.



1/8

Abb. 1:

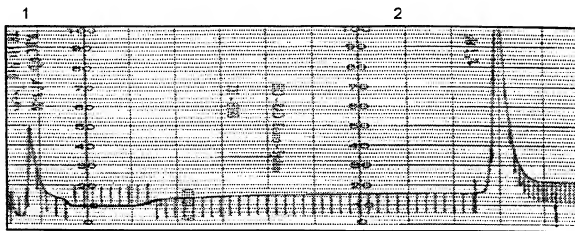


Abb. 2:

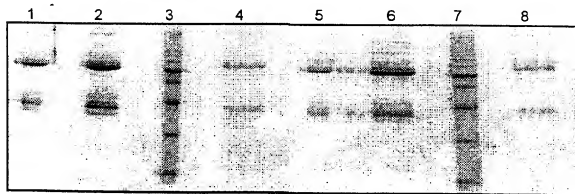
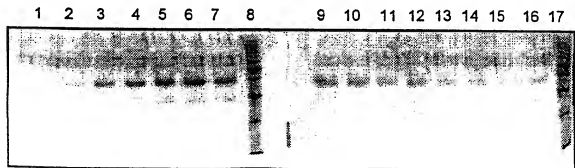


Abb. 3:



2/8

Abb. 4:

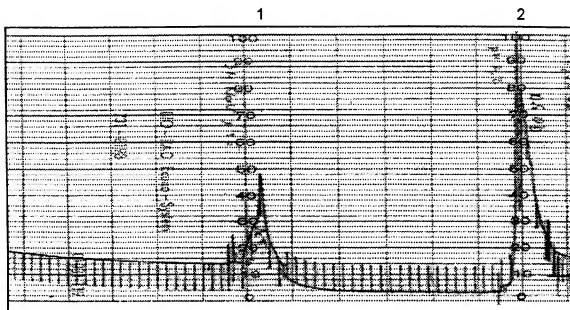


Abb. 5:

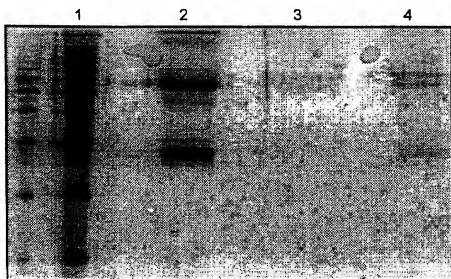


Abb. 6:

3/8

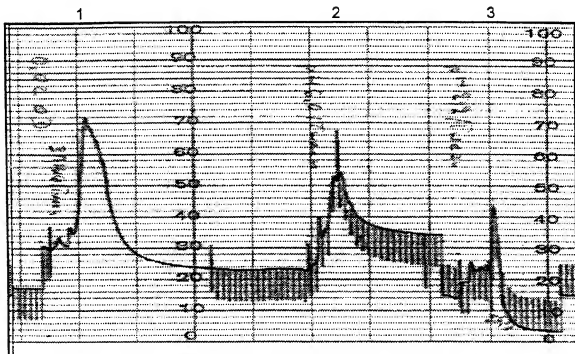


Abb. 7:

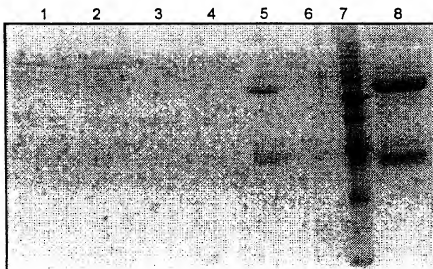


Tabelle 3: Bestimmung der biologischen Aktivität von immobilisiertem humanen IgG (gekoppelt unter Elutionsbedingungen) mittels Bindungs-Elutions-Versuche mit anti-human-IgG-Antikörper (Ziege) durch Affinitätschromatographie

ONB-aktivierter	Kopplungs- bedingungen	Menge gekoppelten human IgG mg/ml Gel	anti-human IgG- Bindungskapazität mg Antikörper/ml Gel	Bindungseffizienz des immobilisierten IgG µg Antikörper/mg IgG	Relative Träger Aktivität (%)
Pericellulose	0,5 M Phospat pH 7,2	2,3	4,1	1800	100
Pericellulose	0,5 M Phospat pH 7,2	6,2	4,1	660	100
Pericellulose	0,1 M Citrat pH 3,0	6,2	2,2	360	54
Pericellulose	0,1 M Citrat pH 3,0	3,8	4,3	1100	105
Pericellulose	4,5 M MgCl <sub>2</sub> pH 6,0	1,4	2,5	1790	61
Sephacrose 6FF	0,5 M Phospat pH 7,2	3,5	3,2	910	78
Sephacrose 6FF	0,1 M Citrat pH 3,0	1,2	2,5	2080	61
Sephacrose 6FF *	0,1 M Citrat pH 3,0	5,0	3,3 <sup>b</sup>	660	80
Sephacrose 6FF	0,1 M Citrat pH 3,0	5,0	3,8 <sup>c</sup>	760	93
Sephacrose 6FF	0,1 M Phosphat pH 12,0	2,8	3,2	1140	78
Sephacrose 6FF	4 M Guanidin-HCl pH 7,3	2,0	3,7	1850	90

\* Aktiviert mit CLCO-ONB in Anwesenheit tertiärer Amine (Basen-katalysiert). Aktivierungsgrad 20 µmol ONB-Carbonatgruppen/ml Gel; Kopplungseffizienz: 57 %

<sup>b</sup> 5,3 mg affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper in 9,2 ml neutralisierten Elutionspuffer; Flußrate 0,1 ml/min; Waschpuffer: PBS, 3 M NaCl (pH 5,0); Elution bei Flußrate von 1 ml/min; 63 % der angebotenen Antikörper wurden eluiert.

<sup>c</sup> 5,3 mg affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper in 9,2 ml neutralisierten Elutionspuffer; Flußrate 0,1 ml/min; Waschpuffer: PBS, 3 M NaCl (pH 5,0); Elution bei Flußrate von 0,5 ml/min; 70 % der angebotenen Antikörper wurden eluiert.

Tabelle 4: Bestimmung der Bindungskapazität von humanen IgG [Antigen (Ag)], immobilisiert mittels Basen-aktivierter ONB-Carboxyl Sepharose 6FF bei pH 3,0, durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von anti-human IgG [Antikörper(Ak)] im Überschuß

Versuchs-Nr.	Immobilisiertes Ag mg/ml Gel	Ak-Angebot mg/Lauf	Ak-Konzentration µg/ml	Verhältnis Ak:Ag	Durchführung	Flußrate ml/min	PBS-Waschung Gel-Vol	Menge elierter Ak mg/ml Gel	Bindungskapazität % <sup>a)</sup> 2 AK/Ag
1	5,0	6,2	1030	2,5	BA	3h RT	20	10,4	104
2	5,0	-----	-----	2,5	BAE	Batch	400 <sup>a)</sup>	7,1	71
3	5,0	-----	-----	2,6	BAE	Batch	320 <sup>a)</sup>	7,5	75
4	5,0	3,1	210	4,2	BAL	0,02	22	13,7	137
5	5,0	4,1	1050	2,3	ML	0,1	22	7,1	71
6	5,0	4,1	210	2,3	ML	0,1	86	7,7	77
7	5,0	5,7	300	3,3	ML	0,02	22	11,4	114
8	5,0	5,6	925	3,2	MC	0,5	200 <sup>a)</sup>	9,7	97
9	5,0	7,2	210	4,1	MC	0,5	300 <sup>a)</sup>	9,7	97
10	5,0	4,2	525 <sup>c)</sup>	2,4	MCAC	0,5	400 <sup>a)</sup>	9,7	97

RT Raumtemperatur

BA Batchverfahren

BAE Elution der im Batchverfahren gebundenen Ak (Versuch 1) nach PBS-Waschen in der Säule

BAL Zusätzliches Angebot von Antikörper zum im Batchverfahren gebundenen Antikörper; Waschen und Elution über die Säule

ML „Micro“-Affinitätschromatographie mit herkömmlichen Beladen mit geringsten Antikörpern

MC „Micro“-Affinitätschromatographie mit Beladen der Säule durch Zirkulation der gereinigten Antikörper

MCAC „Micro“-Affinitätschromatographie mit Antiserum, verdünnt in PBS, durch Zirkulation

<sup>a)</sup> Um die im Überschuß angebotenen Antikörper und/oder adsorptiv gebundene Proteine zu entfernen, wurde mit PBS gewaschen. Das Waschen wurde durch mehrere Stundenintervalle (bzw. 16 h) unterbrochen, bevor das Elutionsprogramm gestartet wurde.

<sup>b)</sup> Die Menge des anti-human IgG (Ak) wurde spektrophotometrisch bei  $\lambda_{280}$  ( $E^{1\%}_{1\text{cm}} = 1,38$ ) nach Neutralisation mit 0,5 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  bestimmt. Eine Bindungskapazität von 100 % wird angenommen, wenn jedes immobilisierte IgG-Molekül 2 Moleküle anti-IgG bindet.

<sup>c)</sup> Antiserum, 1 : 8 verdünnt in PBS

Tabelle 6. Immobilisierung von anti-HSA-HSA an Basen-katalysierte, aktivierte ONB-Carbonat-Sephrose 6FF in Kopplungsmedien, die als Elutionsmedien für Immunaффinitätschromatographie genutzt werden

$\mu\text{mol ONB-Carbonatgruppen}$ pro ml Gel	Kopplungsmedium	pH	angebotene mg/ml Gel	Proteinmenge mg/ml Lösung	immobilisiertes Protein mg/ml Gel	Kopplungsergebnis %
19,8	0,5 M Phosphat	7,3	1,6 A	0,3	1,1	70
31,6	0,5 M Phosphat	7,3	3,9 HSA	3,9	1,7	43
5,1	0,1 M Phosphat	7,3	1,6 A	0,3	0,6	34
22,3	Elutionspuffer	3,0	3,2 A	0,6	2,3	70
20,3	Elutionspuffer	3,0	5,0 D	1,6	3,4	67
10,8	Elutionspuffer	3,0	3,8 B	0,5	2,3	60
19,8	Elutionspuffer	4,0	3,8 B	0,7	1,2	32
22,3	Elutionspuffer	3,0	5,7 C	0,9	2,9	50
19,8	4 M Guanidin-HCl	7,3	11,3 B	11,3	4,9	43
22,3	0,1 M Phosphat	12,0	4,8 B	2,0	1,3	28

A anti-HSA

B anti-HSA/HSA 1 : 1

C anti-HSA/HSA 1 : 2

D anti-human-IgG/human IgG 1 : 1

Tabelle 7: Nachweis der biologischen Aktivität (Bindungsfähigkeit) von Antigenen und Antikörpern am Modell von anti-HSA/HSA nach deren Immobilisierung an Basen-katalysierte, aktivierte ONB-Carbonat-Sepharose 6FF unter Spaltbedingungen für Immunkomplexe

Immobilisierungs- bedingungen <sup>a)</sup>	Proteinangebot /ml Gel	Konzentration µg/ml	Bindungsbedingungen	PBS-Waschen	Bindungskapazität µg/ml Gel
1. 10,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 3 2,3 mg/ml	3,0 mg HSA	1055	0,3 ml/min, 43 min Kreislauf	0,028 ml/min, 43 min	100-200
2. 10,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 3 2,3 mg/ml	13,4 mg HSA	937	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	100-200
3. 10,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 3 2,3 mg/ml	3,7 mg anti-HSA	164	0,5 ml/min, 135 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	2100 (= 0,9 mg HSA)
4. 19,8 µmol anti-HSA, pH 7 1,1 mg/ml	6,1 mg HSA	531	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	100-200
5. 19,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, pH 4 1,2 mg/ml	4,2 mg anti-HSA	368	0,5 ml/min, 180 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	1211 (= 0,5 mg HSA)
6. 19,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, 4M Guan. 4,9 mg/ml	8,3 mg HSA	578	0,5 ml/min, 90 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	Spuren
7. 19,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, 4M Guan. 4,9 mg/ml	7,3 mg anti-HSA	470	0,5 ml/min, 180 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	4714 (= 2,1 mg HSA)
8. 19,8 µmol anti-HSA/HSA 1:1, 4M Guan. 4,9 mg/ml	5,1 mg anti-Kan IgG	360	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	1977 (36 %)

Immobilisierungs- bedingungen	Proteinangebot /ml Gel	Konzentration µg/ml	Bindungsbedingungen	PBS-Waschen	Bindungskapazität µg/ml Gel
9. 10,8 µmol anti-HSA/HSA, 1:1, pH 3 2,3 mg/ml	5,1 mg anti-Kan IgG	360	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	1480 (54 %)
10. 19,8 µmol anti-HSA, pH 7 1,1 mg/ml	5,1 mg anti-Kan IgG	360	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	2246 (100 %)
11. 22,3 µmol anti-HSA, pH 3 2,3 mg/ml	5,1 mg anti-Kan IgG	360	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	2246 (48 %)
12. 22,3 µmol anti-HSA, pH 3 2,3 mg/ml	13,8 mg HSA	926	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	100-200
13. 22,3 µmol anti-HSA/HSA, 1:2, pH 3 2,9 mg/ml	6,9 mg anti-HSA	477	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	3586 (= 1,6 mg HSA)
14. 22,3 µmol anti-HSA/HSA, 1:2, pH 3 2,9 mg/ml	11,2 mg HSA	784	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	100-200
15. 22,3 µmol anti-HSA/HSA, 1:1, pH12 1,3 mg/ml	6,8 mg HSA	600	0,5 ml/min, 70 min Kreislauf	0,5 ml/min, 60 min	100-200
16. 22,3 µmol anti-HSA/HSA, 1:1, pH12 1,3 mg/ml	4,4 mg HSA	424	0,5 ml/min, 120 min Kreislauf	0,5 ml/min, 90 min	1579 (=0,7 mg HSA)

a) µmol-Angabe: aktive Gruppen pro ml Gel